

Bioluminescence를 이용한 세포의 상태 분석법

Andrew Paine/Cambrex 사

Culture 중인 세포는 여러 가지 상태로 존재할 수 있다. 활발하게 증식하고 있는 세포, 독성 물질이나 부적절한 영양공급으로 손상 받은 세포, 예정된 세포사멸(apoptosis)의 과정으로 진행되는 세포도 있을 수 있다. 이런 세포의 생존(Cell viability), 독성(Toxicity), 사멸(Apoptosis)을 측정하기 위하여 bioluminescence를 이용한 assay 방법이 널리 이용되고 있으며, 이를 이용하여 일반적인 세포연구, drug discovery 및 독성연구에 이용하고 있다.

Bioluminescent를 이용하는 assay의 기본 원리는 세포생존(cell viability) 유지에 필수적인 요소인 ATP를 측정하는 것이다. ATP는 건강한 세포에서는 정확하게 조절되지만, 세포의 죽음과 동시에 급격한 분해가 일어난다. ATP는 North American firefly의 일종인 Photinus pyralis에서 발견된 luciferase라는 효소를 이용하여 측정할 수 있다. Luciferase는 ATP와 기질인 luciferin 사이의 반응을 촉매하여 빛을 생성시킨다(그림 1). Luciferin과 luciferase가 과량으로 존재할 경우 생성되는 빛의 양은 ATP의 양에 직접적으로 비례한다.

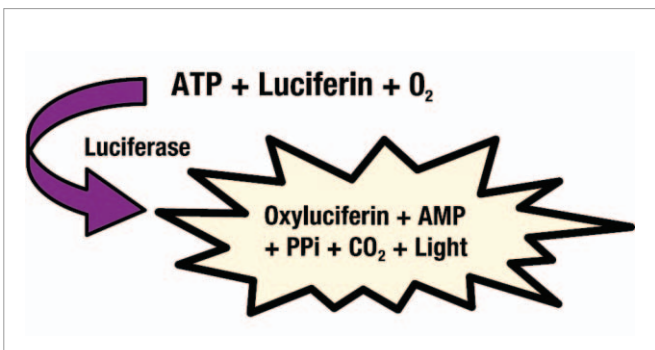


그림 1 Luciferase enzyme을 이용한 빛의 생성

살아있는 세포에서는 세포 내 ATP의 수준이 일정하게 유지되지만 배양 중인 세포의 ATP 수준은 생존하고 있는 세포 수와 직접적인 관련이 있다. 따라서, ATP의 측정은 세포증식(Proliferation)을 측정하기 위한 강력한 수단이 되며, 배양 중에 있는 세포의 증식속진과 저해를 정확하게 측정할 수 있다(그림 2). Cambrex의 ViaLight™ Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity BioAssay Kit는 포유동물 세포(mammalian cells)로부터 효과적으로 ATP를 방출시키고 endogenous 효소를 불활성화 시키고 동시에 ATP의 양을 측정하는 동일한 두 단계의 반응을 적용하고 있으며 15분 이내에 결과를 얻을 수 있다.

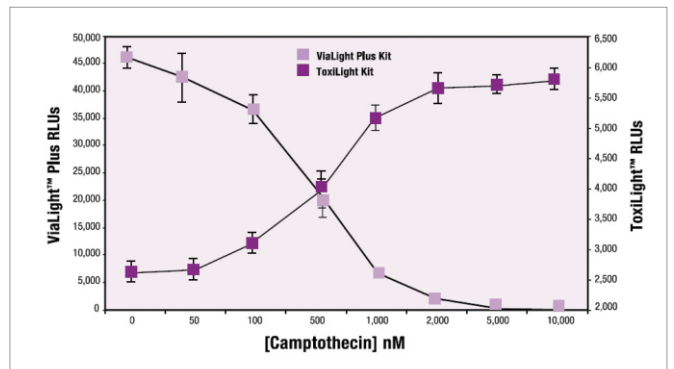


그림 2 A226 myeloma cell에서 topoisomerase inhibitor인 camptothecin의 농도에 따른 영향.

ViaLight™ plus kit for ATP detection kit로 cell viability를 측정하고, ToxiLight™ 로 membrane permeability(cytolysis)를 측정하였다. N=3±SD

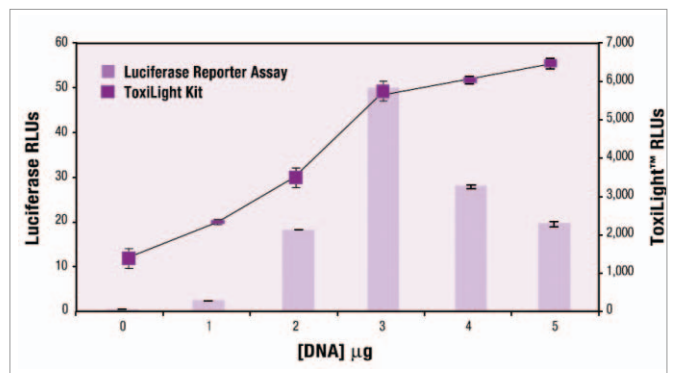


그림 3 DNA 농도의 증가에 따른 HUVEC cell의 transfection 효과

Reporter gene assay를 한 동일한 시료로 ToxiLight™ Kit 를 이용하여 cell viability를 측정하였다.

세포가 독성물질 등에 노출되어 세포막이 손상되었을 경우 세포 내 효소들은 세포 밖으로 유출된다. 이 효소들 중 Lactate Dehydrogenase(LDH)와 Adenylate Kinase(AK)는 대표적인 효소로 AK는 아주 보편적인 효소로 ADP를 활발하게 인산화하여 ATP를 형성한다. ToxiLight™ Non-Destructive Cytotoxicity Bioassay Kit는 이런 원리를 이용하고 있다. 배양 중에 있는 배지 분주액에 ADP, luciferin, luciferase를 포함한 cocktail을 첨가하면 AK는 ADP를 ATP로 인산화시키고 luciferase는 luciferin과 ATP의 반응을 촉매하여 빛을 나타내게 된다. 이 빛은 세포배양액 내에 존재하는 AK의 양에 비례하며, AK의 양은 손상받은 세포의 수에 비례한다.

이 ToxiLight Kit는 세포를 파괴하지 않는 Non-destructive assay 방법이므로 여러 번 시료를 반복하여 측정이 가능하며 다른 부가적인 assay에 동일시료를 이용할 수 있는 장점이 있다. 따라서 시료의 상등액을 이용하여 세포 사멸 정도를 측정할 수 있으며 또 다른 실험적 지표나 실험을 위하여 살아있는 세포를 이용할 수 있다(그림 2, 3)

하나의 세포가 죽음에 이르면 세포사멸(apoptosis)이라고 하는 과정으로 들어 간다. 이 경우 세포 내 ADP와 ATP의 정확한 조절 기능은 상실 되고 ADP level이 상승하게 된다. 이 ADP의 상승은 ATP의 감소를 수반하여, ADP와 ATP의 비율이 변하게 된다. ApoGlow™ Rapid Apoptosis Screening Kit는 세포 내 ATP에 대한 ADP의 수준을 형광을 이용하여 96 well 형태로 측정함으로써 apoptosis, necrosis 및 세포증식을 구별할 수 있다. 20분 이내에 결과 도출이 가능하며 100 cells/well 이하까지 검출할 수 있다.

Bioluminescence로 ATP를 측정하는 것은 간단한 방법으로 다양한 분야로의 적용이 가능하다. ViaLight™ BioAssay Kits는 배양중인 세포의 proliferation, ATP level로 살아있는 세포 측정이 가능하여 본 제품으로 proliferation, cytolysis, growth arrest 분석까지 가능하다. ToxiLight™ BioAssay Kits는 non-destructive cytolysis 분석을 위한 제품이며, ApoGrow Screening Kit는 96 well 형태의 apoptosis 분석을 하기 위한 제품이다.

참고문헌

1. Crouch, S.(2000) Biocompatibility testing ATP bioluminescence. *Med Device Technol*, **11**(8): 12-5.
2. Slater, K.(2001) Cytotoxicity tests for high throughput drug discovery. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 70-74.

3. Crouch, S., Kozlowski, R., Slater, K., Fletcher, J.(1993) The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* **160**(1): 81-8.
4. Bradbury, D., Simmons, T., Slater, K., Crouch, S.(2000) Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J Immunol Methods* **243**: 167-190.
5. Cunningham, B.(2002) A glowing result, LumiTech's ApoGlow kit provides rapid and sensitive detection of cellular proliferation, apoptosis, and necrosis. *The Scientist* **14**(15): 31.

관련제품

ViaLight Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity BioAssay Kit

LT07-221	500 Tests
LT07-121	1,000 Tests
LT07-321	10,000 Tests
LT17-221	500 Tests, with Plates

ToxiLight Non-Destructive Cytotoxicity BioAssay Kit

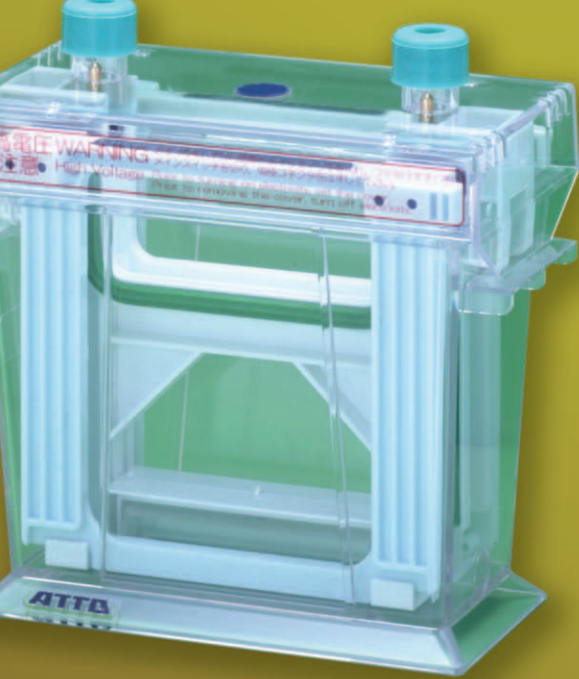
LT07-217	500 Tests
LT07-117	1,000 Tests
LT07-317	10,000 Tests
LT17-217	500 Tests, with Plates

ApoGlow Rapid Apoptosis Screening Kit

LT07-115	200 Tests
----------	-----------

<Cambrex Bioassay Kit Selection Guide>

BioAssay	Application	Sensitivity Detection Limits	Detection Method	Plate Type
ViaLight™ BioAssay Kit(Plus, HS)	Cell Proliferation			
	Cytotoxicity	10 cells	Luminescence	96, 384
	Cell Attachment			
ViaLight BioAssay Kit(HT)	Cell Proliferation			
	Cytotoxicity	100 cells	Luminescence	96, 384
	Cell Attachment			
ViaLight Bioassay Kit(MDA)	Cell Proliferation	1,000 bacterial cells	Luminescence	96, 384
	Cytotoxicity	100 yeast cells		
ToxiLight™ Bioassay Kit	Cytotoxicity	10 cells	Luminescence	96, 384
	ApoGlow™ Screening Kit	Apoptosis	Luminescence	96, 384
	Necrosis	100 cells		
MycoAlert™ Detection Kit	Mycoplasma		Luminescence	Cuvette, 96
	Detection	50 cfu/mi		
PKLight™ Assay Kit	Kinase Activity	<10 ng	-	96, 384, 1536
OsteoAssay™ Human Bone Plate	Bone Resorption			
	Osteoclast Precursor Differentiation		Luminescence	96
	Osteoclast Enzyme Activity	-		
OsteoLyse™ Assay Kit(Human Collagen)	Bone Resorption		Fluorescece	96
	Osteoclast Precursor Differentiation	-		
CELISA™ BioAssay Kit	Hematopoietic Differentiation		Fluorescece	96
	Toxicity	-		



전기영동을 위한 올바른 선택

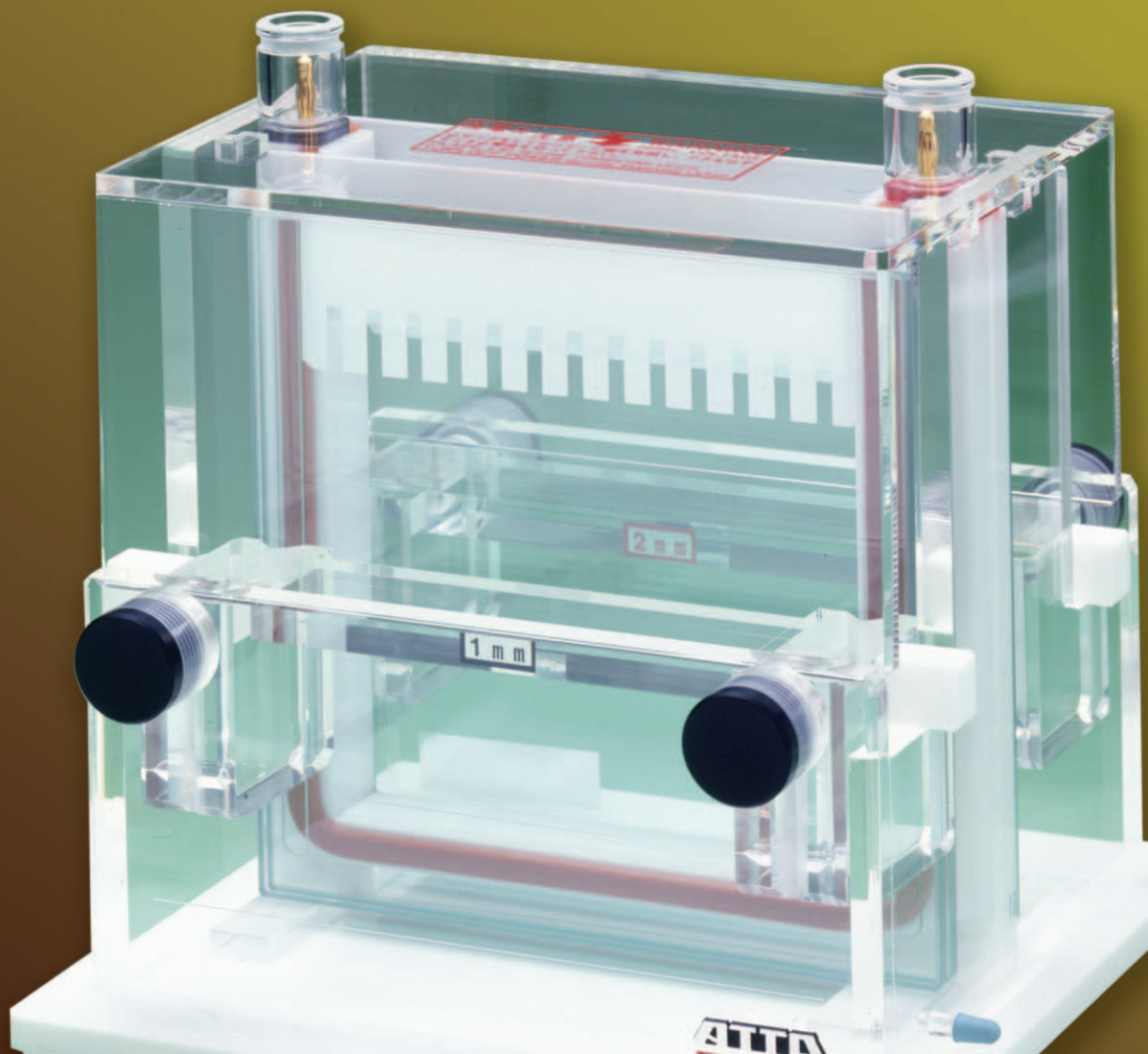
ATTO

ATTO 공급 기념 1,700여 전 제품

20% 가격인하!

기간: 2005년 6월 1일~7월 30일

- Gel Documentation System
- Bio/Chemiluminescence Detection System
- Spectrometer
- Electrophoresis Systems for Protein Analysis
- 2-D Electrophoresis System
- Electrophoresis System for Nucleic Acids
- Power Supply
- Blotting System
- Fermentation Measurement System



● **Mini-slab size Electrophoresis system**

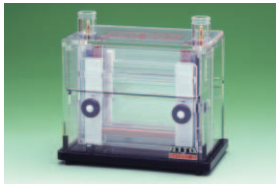
AE-6531M/P mPAGE(pageRun)

전원 일체형 mini slab 전기영동장치
Polyacrylamide gel 용
Gel size : 85×90×1mm(표준)
전기영동 gel 매수 : 최대 2매



AE-6450 Dual Mini Slab Kit

Mini slab 전기영동장치
Polyacrylamide gel 용
Gel size : 85×90×1mm(표준)
전기영동 gel 매수 : 최대 2매



AE-6401 DUAL Mini Gel Cast

Mini slab gel 용 Gel caster
Plate size : 120×102mm
Gel size : 85×90×1mm(표준)
구성 : Glass plate set(2set)
divider plate(2), gasket(2),
clip(2), Comb(2),



● **Compact- size Electrophoresis system**

AE-7341 cPAGE Twin

전원 일체형 compact mini slab 영동장치
Polyacrylamide gel 용
Gel size : 60×60×0.75mm(표준)
전기영동 gel 매수 : 최대 2매
전기영동 시간 : 약 30분



AE-7340 cPAGE Twin

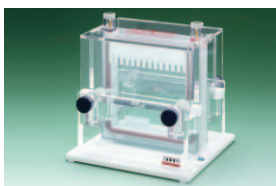
Compact mini slab 전기영동장치
Polyacrylamide gel 용
Gel size : 60×60×0.75mm(표준)
전기영동 gel 매수 : 최대 2매
전기영동 시간 : 약 30분



● **Slab-size Electrophoresis system**

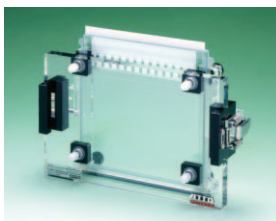
AE-6220 Dual Slab Chamber

Slab 전기영동장치
Polyacrylamide gel 용
Gel size : 138×130×1 mm(표준)
전기영동 gel 매수 : 2매



AE-6210 Slab Gel Cast

Slab Gel 용 Gel caster
Plate size : 160×160, 10.5~12mm
Gel size : 138×130×1 mm(표준)
제작 Gel 매수 : 1매(AE-7310)
2매(AE-7344)



● **1st Dimension 전기영동(IEF)**

AE-6541 Disc Gel EP Kit(discRun)

전원 일체형 IEF 전기영동 장치
Polyacrylamide / Agarose gel 용
Gel size : ϕ 2.5×50 ~75mm(표준)
전기영동 gel 수 : 최대 8 gels



AE-6540 Disc Gel EP Kit

IEF 전기영동 장치
Polyacrylamide / Agarose gel 용
Gel size : ϕ 2.5×50 ~75mm(표준)
전기영동 gel 수 : 최대 8 gels



● **2-D Agarose Electrophoresis system**

AE-6310 Ag-Pag 2-D System

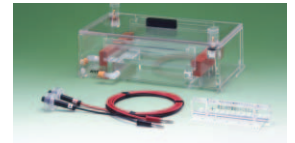
Agarose 2-D 전기영동 장치
Agarose gel/Polyacrylamide slab gel 용
Gel size : ϕ 3.5×175mm(표준, disc)
200×180×1.5mm(Slab)
전기영동 gel 수 : 최대 12 gels(disc), 2매(slab)
냉각 온도 control 가능



● **핵산 전기영동 장치**

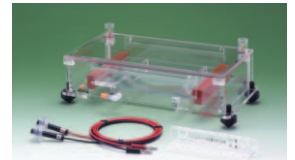
AE-6111 Agarose EP Kit

Agarose gel 전기영동 장치
Gel size : 120×160mm
Comb : 26/13 well, UV 투과 tray



AE-6125 Agarose EP Kit

Agarose gel 전기영동 장치
Gel size : 150×200mm
Comb : 32/16 well, UV 투과 tray



● **SSCP**

AE-6290 ResolMax Slab

온도 control 이 가능(SSCP)한 slab전기영동 장치
Two channel, two-sided 온도 control
Polyacrylamide gel 용
Gel size : 130×135×0.75mm(표준)
전기영동 샘플 수 : 최대 15개



AE-6160 Genoquencer SSCP

온도 control 이 가능(SSCP)한 slab전기영동 장치
Water jacket 에 의한 온도 control
Polyacrylamide gel 용
Gel size : 280×370×0.35mm(표준)
전기영동 샘플 수 : 최대 48개



● **Power Supply**

AE-8150 myPower 500

소형, 저가형 power supply
출력전압 : 1~500V, 전류 : 1~300mA(max, 25W)
설정전압 : 1~500V, 전류 : 1~300mA(1V, 1mA step)
Timer : 0~999분(1분 step)
출력단자 : 병렬 2 set



AE-8450 Power station 1000VC

고성능 power supply
출력전압 : 10~1000V, 전류 : 4~500mA(max, 200W)
설정전압 : 5~1000V, 전류 : 2~500mA(5V, 2mA step)
Timer : 0~1000분(1분 step)
출력단자 : 병렬 4 set



*상기 제품 외에도 1,700여종의 다양한 제품이 준비되어 있습니다.